

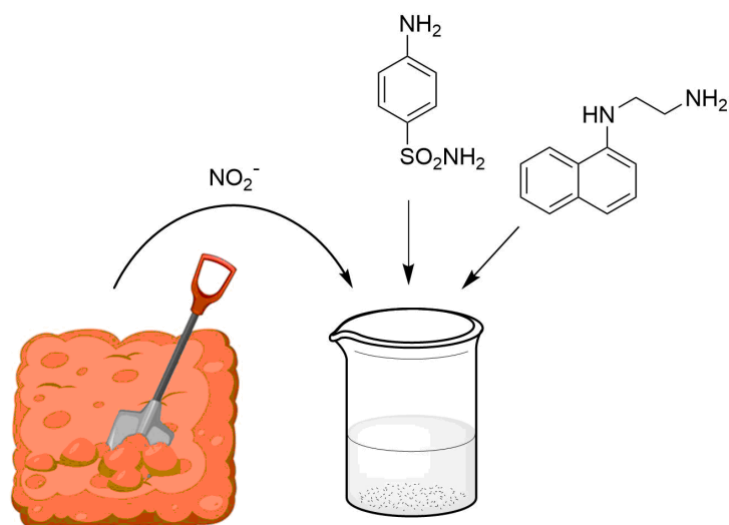
Chemiepraktikum 376-0010-00P FS22

Kapitel 1

Analytik von Nitrit

Spektrophotometrischer Nachweis

Assistenten:

Lara Pfuderer (plara@student.ethz.ch)Jacob Lesinski (jacob.lesinski@chem.ethz.ch)

1 Allgemeines

In diesem Kapitel wird die quantitative Analytik am Beispiel der Bestimmung des Nitritgehaltes genauer angeschaut. Nitrit (NO_2^-) ist in vielen analytischen Untersuchungen Gegenstand von Interesse. Vor allem in Bezug auf Bodenproben, Düngung und Trinkwasserqualität, aber auch im Zusammenhang mit Urinproben, Stoffwechselprodukten und in Verbindung mit Hydrolyse von Abgasen in Regenwasser. Das prinzipielle Vorgehen bei einer solchen Analyse ist dabei immer gleich: Probennahme – Probenaufbereitung – Methodenwahl – Messung – Eichkurve erstellen – kritische Auswertung. In diesem Versuch soll als Endresultat die Konzentration von Nitrit pro Kilogramm Bodenprobe bestimmt werden.

Mitbringen

Für diesen Versuch sind von den Studierenden Bodenproben (ca. 50 g, möglichst frisch) und ein Taschenrechner mitzubringen.

Laborjournal

Es muss pro Person ein Laborjournal geführt werden. Folgendes soll darin enthalten sein: Name und Datum, jeder experimentelle Schritt stichwortartig beschrieben, Messdaten (genaue Einwaage, Materialien, verwendete Chemikalien, Resultate), kurze Interpretation der Resultate. Die Anleitung muss also nicht Wort für Wort abgeschrieben werden. Die Aufgaben in der Anleitung können auf einer separaten Seite ins Laborjournal gelöst werden.

Aufgabe 1)

Zeichnen Sie die Lewis-Strukturen von Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-).

2 Theorie

2.1 Einleitung

Das Hauptaugenmerk in den folgenden Versuchen gilt der Methode. Wie werden analytische Daten erlangt? Oft gibt es verschiedene chemische Wege, ans Ziel zu kommen. Das Hauptproblem ist es, reproduzierbare, vergleichbare und verlässliche Werte zu erhalten. Für die Analyse gilt generell, dass unabhängige Referenzmessungen benötigt werden. Dazu macht man eine Eichkurve. Mit der gewählten Methode werden genau bekannte Proben vermessen, die den gesamten durch die Probe zu erwartenden bzw. durch die Methode limitierten, sinnvollen Messbereich abdecken. Für die unbekannt Probe kann der Messwert durch geschickte Interpolation bestimmt werden.

2.2 Photospektrometrie

Die Photospektrometrie zählt zu den am häufigsten verwendeten quantitativen Analysemethoden. Sie beruht auf der charakteristischen Lichtabsorption von Substanzen in Lösung. Betrachtet wird dabei die Absorption im ultravioletten (UV, 100-380nm) und sichtbaren (VIS, von engl. visible, 400-700nm) Bereich der elektromagnetischen Strahlung. Absorption in diesem Frequenzbereich führt zur Anregung von Elektronen in höhere Schalen bzw. Zustände. Wird nun ein Farbstoff mit weissem Licht bestrahlt, absorbiert er eine bestimmte Wellenlänge. Diese spezifische Wellenlänge fehlt im reflektierten Licht, das auf unser Auge fällt. Wir nehmen dann die Komplementärfarbe der absorbierten Wellenlänge wahr. *Für eine genauere Beschreibung siehe auch die Praktikumsanleitung zum Versuch Lebensmittelfarbstoffe.*

Ist der zu analysierende Stoff selbst kein Farbstoff, kann dieser in einer Derivatisierungsreaktion zu einem Farbstoff umgewandelt werden. Im Falle von Nitrit ist das nötig, da das Ion selbst farblos ist. Es wird deshalb eine sogenannte Griess-Reaktion (Abb. 1) durchgeführt. Dabei wird das aus der Probe aufbereitete Nitrit mit Sulfanilamid (4-Aminobenzensulphonamid) unter sauren Bedingungen (pH = 0 – 2) in einer Diazotierungsreaktion umgesetzt. Im Anschluss reagiert das entstandene Diazoniumsalz mit N-(1-naphthyl)-ethylendiamindi-hydrochlorid zu einem pinken Farbstoff.

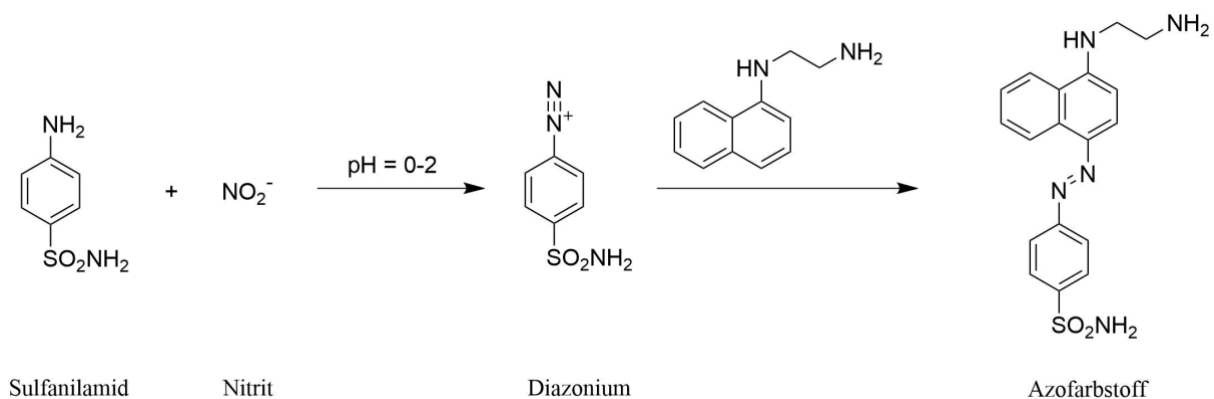


Abbildung 1 Reaktionsgleichung der Griess-Reaktion: Das zu analysierende Nitrit-Ion wird mit Sulfanilamid zunächst zum Diazonium und im Anschluss mit einer Kupplungsreaktion zu einem Azofarbstoff umgesetzt.

Die Menge des Farbstoffes wird bestimmt, indem mit einem Spektrophotometer gemessen wird, wie viel Licht der Farbstoff bei einer bestimmten charakteristischen Wellenlänge (550 nm für Nitrit) absorbiert. Die Menge kann bestimmt werden, wenn bekannt ist, wie der zu analysierende Stoff zum Farbstoff reagiert. Die Menge des Analyten ist dann limitierend für die Menge des entstehenden Farbstoffes.

2.3 Gesetz von Lambert-Beer

In einem klassischen Absorptionsexperiment wird Licht im Bereich der Wellenlänge, bei der die Probe absorbiert, durch die Lösung geschickt. Während der Lichtstrahl die Lösung passiert, absorbieren die Farbstoff-Moleküle einen Teil der Strahlung. Wie viel Strahlung absorbiert wird, hängt nun von der Anzahl an Molekülen (also der Konzentration) ab, aber auch von der Schichtdicke der Probe. Ist der Weg des Lichtstrahls durch die Probe länger, wird entsprechend mehr absorbiert. Gemessen wird dann die verbliebene Strahlungsintensität nach der Probe. In Abb.2 ist der Versuchsaufbau eines linearen Absorptionsexperimentes schematisch dargestellt:

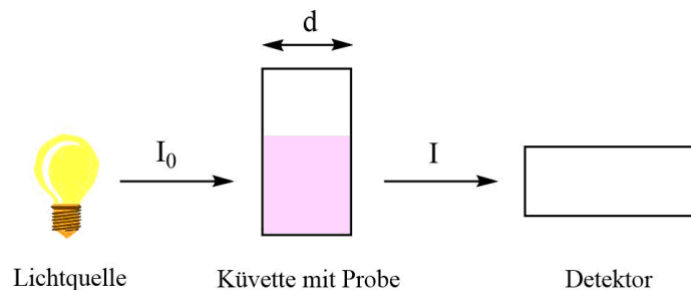


Abbildung 2 Aufbau eines linearen Absorptionsexperimentes.

Das Verhältnis der Anfangsintensität der Strahlung I_0 und der Intensität I nach Durchlaufen der Probe wird Transmission T genannt:

$$T = I_0 / I$$

Der negative Zehnerlogarithmus dieses Ausdrucks ist als Absorption A definiert:

$$A = - \log_{10} (I_0 / I)$$

Das Lambert-Beer'sche Gesetz verknüpft nun die Absorption A mit der Konzentration c und der Schichtdicke d der Küvette, die die Probe enthält:

$$A = - \log_{10} (I_0 / I) = \varepsilon(\lambda) \cdot d \cdot c$$

wobei $\varepsilon(\lambda)$ den Extinktionskoeffizienten darstellt, der charakteristisch für den betrachteten Stoff und die Wellenlänge λ ist.

Für eine konstante Schichtdicke d kann nun die Konzentration der Lösung variiert werden. Die Absorption aufgetragen gegen die verschiedenen (bekannten) Konzentrationen ergibt dann eine Gerade. Die zugehörige Geradengleichung kann mittels einer linearen Regression erhalten werden (Abb. 3). Ist diese Gleichung bekannt, kann anhand der gemessenen Absorption auch für unbekannte Proben die Konzentration bestimmt werden, ohne dass man dabei den Extinktionskoeffizienten ε zu kennen braucht. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die lineare Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration nur in einem gewissen Bereich gültig ist. Für hohe Konzentrationen tritt in der

Geraden eine Krümmung auf. In diesem gekrümmten Bereich ist das Gesetz von Lambert-Beer nicht mehr gültig.

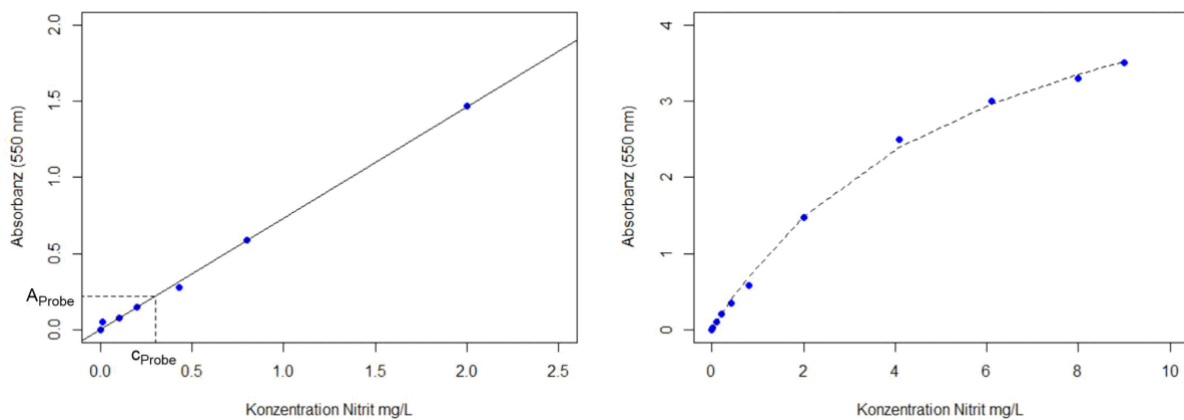


Abbildung 3 Auftragung der Absorbanz gegen die Farbstoffkonzentration der entsprechenden Lösung. *Links:* Die Datenpunkte folgen einer linearen Abhängigkeit und das Lambert-Beer'sche Gesetz kann zur Bestimmung der Probenkonzentration angewandt werden (siehe gestrichelte Linien). *Rechts:* Ab einer Absorbanz von 2 zeigt die Kurve eine deutliche Krümmung. Die lineare Abhängigkeit ist nicht mehr gegeben und das Lambert-Beer'sche Gesetz kann nicht mehr angewandt werden.

3 Experimente

Entsorgung

Alle Lösungen, die im Rahmen dieses Versuchs hergestellt werden, können verdünnt in den Abfluss entsorgt werden.

3.1 Probennahme und Aufbereitung

Bodenprobe

- Halten Sie Herkunft, Probennahme (Datum) und Lagerung in Ihrem Laborjournal fest. Die Bodenprobe sollte möglichst frisch sein, da bakterielle Nitrit-Abbauprozesse die Messwerte verändern oder verfälschen können. Es muss pro Gruppe nur eine Bodenprobe analysiert werden.
- 25 g Erde (genaue Einwaage notieren) in 100 mL deionisiertem Wasser in einem Becherglas suspendieren
- Die Suspension nach kurzem Absetzen zuerst einmal durch Haushaltspapier (3 Lagen), dann einmal durch einen 15 mm Papierfilter filtrieren. Dabei sollten möglichst viele größere Erdpartikel zurückgehalten werden.
- Anschliessend das Filtrat einmal durch einen feinporigen (200 nm) Nalgene Filter unter Vakuum filtrieren.

Flusswasser

- Die Flusswasserprobe wird von den Assistenten ausgeteilt und muss nicht mehr filtriert werden.

Aufgabe 2)

Nehmen Sie an, dass sie anstatt 100 mL neu dreimal so viel deionisiertes Wasser verwendet haben, um die gleiche Menge Erde zu suspendieren. Da Sie aber dementsprechend mehr Haushaltspapier und Filterpapier zum Filtrieren benötigen, werden anstatt 50 mL neu 100 mL Wasser aufgesaugt. Wie verändert sich die Konzentration von Nitrit im Filtrat Ihrer Bodenprobe im Vergleich zu vor der Filtration?

3.2 Grob- und Schnellanalyse des Nitritgehaltes

Der Nitritgehalt der Boden- und Wasserprobe wird mit insgesamt vier verschiedenen Methoden bestimmt. Die ersten zwei Methoden werden normalerweise verwendet, um Nitrit qualitativ (Detektion, ist Nitrit vorhanden?) und grob quantitativ (ungefähre Menge) zu bestimmen.

Grobanalyse (Quantofix®-Stäbchen)

Diese Analyse ist für die Boden- und die Flusswasserprobe durchzuführen.

- Die Teststäbchen werden 1 s im Filtrat geschwenkt und 1 min an der Luft getrocknet.
- Der Nitritgehalt wird anhand der Farbskala auf dem Testtube bestimmt.
- Interpretieren Sie Ihre Resultate.

Schnellanalyse (Aquaquant®)

Der Test wird entweder mit der Boden- oder der Flusswasserprobe durchgeführt.

- Lesen Sie zuerst die Kurz-Bedienungsanleitung (mit Skizze und Farbskala) des Geräts durch. - Je 5 ml (mithilfe der beigelegten Spritze → nach Gebrauch mit deionisiertem Wasser ausspülen) der gleichen Probe in zwei Pillengläser geben.
- Das eine Glas mit einem gestrichenen Löffelchen (im Deckel der Dose angebracht) des Pulvers versetzen. Nach gutem Schütteln sollte sich die Lösung pink verfärben.
- Die Konzentration an Nitrit wird anhand eines Farbvergleichs auf der Farbskala bestimmt, indem die gefärbte Probe auf die Reihe der gelben Punkte gestellt wird und die nichtgefärbte Vergleichsprobe darüber auf die Reihe der farbigen Punkte.
- Die Gläser werden verschoben bis die Farbe gleich erscheint, wodurch dann die Konzentration abgelesen werden kann.

Aufgabe 3)

Nach der Quantofix[®] Analyse weist das Teststäbchen eine kaum merkliche Verfärbung auf. Wie könnte getestet werden ob die Teststäbchen überhaupt funktionieren? (Ohne dass ein anderer Test zu Hilfe gezogen wird.)

3.3 Spektrophotometrischer Nachweis von Nitrit

- 10 mL der Proben (je zwei Boden- und Flusswasserfiltrate und eine Eichlösung, die vom Assistenten verteilt wird, Total: 5) in Pillengläser verteilen und mit 0.2 mL der Lösung A (enthält Sulfanilamid) versetzen. Pro Probe werden also zwei Replikate erstellt.
- Die Proben auf dem Magnetrührer für ungefähr 2 min rühren (die Heizplatte sollte nicht betätigt werden!).
- Danach je 0.2 mL der Lösung B (enthält Kupplungsreagenz N-(1-naphtyl)-ethylendiamindihydrochlorid) hinzufügen.
- Die Proben für ungefähr 1 min auf dem Magnetrührer rühren, um die vollständige Farbumsetzung zu ermöglichen.

Aufgabe 4)

Schauen Sie sich die Reaktionsgleichung der Griess-Reaktion (Abb. 1) noch einmal an. Was ist die Endkonzentration des Azofarbstoffes, wenn wir annehmen, dass in der Probe anfänglich 0.1 mmol/L Nitrit vorhanden war? Sie können davon ausgehen, dass das Nitrit vollständig zum Farbstoff umgesetzt wird.

Aufgabe 5)

Die Reaktion von Sulfanilamid und Nitrit findet bei tiefem pH statt. Deshalb haben wir der Lösung A einen grossen Anteil Salzsäure (HCl) hinzugefügt, nämlich 20 wt%. Was ist der Anteil an Salzsäure (wt % = Gewichtsprozent) in unserer Reaktionslösung (Volumen: 10.2 mL)? *Tipp: Die Anzahl Mol Salzsäure bleibt gleich.*

Absorbanzmessung

Die Absorption der erhaltenen pink gefärbten Lösungen wird mittels eines Spektrophotometers bestimmt. Zur Berechnung der Nitritkonzentration muss eine Eichkurve erstellt werden. Dazu werden Lösungen verschiedener bekannter Nitritkonzentrationen (= Eichlösungen) hergestellt (vom Assistenten vorbereitet und verteilt), welche genau wie die Proben behandelt werden. Jede Gruppe erhält eine andere Eichlösung zum Messen.

- Die Farblösung mit einer sauberen Pasteurpipette (für jede Probe eine neue Pipette verwenden) jeweils in Küvetten füllen (etwas mehr als die Hälfte). Wichtig dabei ist, dass die Seiten, die im Lichtstrahl stehen, möglichst klar sind: Kratzer, Fingerabdrücke, usw. können die Resultate verfälschen!

- Mit dem Spektrophotometer wird die Absorption einer Substanz bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen. In heute üblichen Zweistrahlgeräten wird die Absorption in Beziehung zu einer Referenz («Nullwert») bestimmt. Die Assistenten werden die Bedienung der Geräte erklären.
- Die Absorption der Proben wird je dreimal bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550\text{nm}$ (grün) gemessen (technische Replikate).

Die Messung der Absorption der Eichlösungen dient lediglich zur Erstellung der Eichgeraden. Als Referenz muss jeweils die «Null-Probe» (0 mg/L Nitrit) gemessen werden, um mögliche Unreinheiten im Lösungsmittel bzw. in den Lösungen A und B abziehen zu können.

Falls noch nicht alle Werte für die Eichlösungen an der Wandtafel stehen, warten Sie noch mit dem Zeichnen der Eichgeraden und gehen zuerst zu Kapitel 3.4 Visuelle Analyse.

Erstellen der Eichgeraden und Berechnung der Nitritkonzentration

Tragen Sie analog zu *Abbildung 3* die Absorption (gemessen bei $\lambda = 550\text{nm}$) gegen die Konzentration der Eichlösungen auf Millimeterpapier auf und ziehen sie eine Eichgerade durch den Nullpunkt und die gemessenen Werte für die Eichproben (siehe Tabelle an Wandtafel), sodass die Gerade einen möglichst geringen Abstand zu den Messpunkten hat (von Hand mit Lineal genügt). Dieses Vorgehen entspricht einer linearen Regression. Normalerweise wird diese heute standardmässig mit Computerprogrammen durchgeführt. Nun können Sie aus der gemessenen Absorption der Proben die Nitritkonzentrationen bestimmen.

Halten Sie die aus der Eichkurve gelesenen Werte der Nitrit-Konzentration für die Boden- und die Flusswasserproben in Ihrem Laborjournal fest.

Aufgabe 6)

Wir haben für beide Proben (Boden- und Flusswasserprobe) jeweils zweimal die Griess-Reaktion durchgeführt und davon jeweils dreimal die Absorption mit dem Spektrophotometer bestimmt. Würde dies auch normalen wissenschaftlichen Standards genügen? Falls nein, überlegen Sie sich, welche Messung(en) man mindestens noch durchführen müsste.

Aufgabe 7)

Bestimmen Sie nun mit den durch die Eichkurve bestimmten Werten für die Bodenprobe die Menge Nitrit pro kg Erde (mg Nitrit / **kg Erde**)!

3.4 Visuelle Analyse

- Die Lösungen aus den Küvetten nach der spektrophotometrischen Analyse wieder in die richtigen Pillengläser zurück leeren, damit genug Probe für die visuelle Analyse vorhanden ist.
- Nun stellt man eine Probe (wahlweise Fluss- oder Bodenprobe) neben einer farblich ähnlichen Eichlösung auf eine weiße Oberfläche (falls die eigene Eichlösung zu sehr/wenig intensiv gefärbt ist, kann man eine andere Eichlösung von einer anderen Gruppe verwenden).
- Wenn man die beiden Lösungen von oben betrachtet, sollten sie den gleichen Farbeindruck vermitteln. Sonst wird von der dunkleren Lösung mit einer Pipette so viel in ein Becherglas transferiert, bis dies erreicht wird. Messen Sie nun mit einem Lineal die Füllhöhe beider Lösungen (= Schichtdicke d).
- Wie in Kapitel 2.2 erläutert, beschreibt das Gesetz von Lambert-Beer den Zusammenhang zwischen der Absorption A (hier von Auge gemessen), der Farbstoffkonzentration c und Schichtdicke d einer Lösung. Bei gleicher Farbe (d.h. gleicher Absorption der Eichlösung A_E und der Probe A_P) und dem gleichen Farbstoff (d.h. gleichem Extinktionskoeffizienten ϵ) können die Formel für die Eichlösung und diejenige für die Probe gleichgesetzt werden.

$$A_E = A_P$$
$$\epsilon \cdot d_P \cdot c_P = \epsilon \cdot d_E \cdot c_E$$

Der Extinktionskoeffizient ϵ kann dann auf beiden Seiten gestrichen werden. Es bleibt also folgende Gleichung, die nach der Konzentration in der Probe c_P aufgelöst werden kann:

$$c_P = d_E \cdot c_E / d_P$$

Aufgabe 8)

Bestimmen Sie mit den gegebenen Gleichungen die Farbstoffkonzentration in Ihrer Lösung und die Menge an Nitrit in ihrer Bodenprobe (mg Nitrit / **kg Erde**) !